

BEST AVAILABLE COPY



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/37038
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Oktober 1997 (09.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/01494		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. März 1997 (25.03.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 12 779.3 29. März 1996 (29.03.96) DE		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FREY, Bruno [DE/DE]; Hochfeldstrasse 50, D-82377 Penzberg (DE). KÜBLER, Hildegund [DE/DE]; Bussardstrasse 6, D-82362 Weilheim (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
(54) Title: PROCESS FOR THE SPECIFIC MULTIPLICATION OF LONG NUCLEIC ACIDS BY PCR			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SPEZIFISCHEN VERVIELFÄLTIGUNG VON LANGEN NUKLEINSÄUREN DURCH PCR			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to an enzyme mixture consisting of two thermostable DNA polymerases with and without proof-reading activity, a thermostable pyrophosphatase and other auxiliaries for PCR and its use for the multiplication of particularly long single and double-stranded nucleotide fragments. The process for multiplying the long DNA fragments is distinguished in particular by the use of the enzyme mixture, a tricine-NH₃ buffer and an elongation temperature of about 68 °C.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft eine Enzymmischung bestehend aus zwei thermostabilen DNA-Polymerasen mit und ohne proofreading-Aktivität, einer thermostabilen Pyrophosphatase sowie weitere Hilfssubstanzen für die PCR und deren Verwendung zur Vervielfältigung von besonders langen einzel- und doppelsträngigen Nukleotid-Fragmenten. Das Verfahren zur Vervielfältigung der langen DNA-Fragmente zeichnet sich insbesondere durch die Verwendung der Enzymmischung, eines Tricine-NH₃ Puffers, und einer Elongationstemperatur von ca. 68 °C aus.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5 **VERFAHREN ZUR SPEZIFISCHEN VERVIELFÄLTIGUNG VON LANGEN
NUKLEINSÄUREN DURCH PCR**

Die Erfindung betrifft eine Enzymmischung bzw. deren Verwendung zur spezifischen Vervielfältigung von besonders langen Nukleinsäuresequenzen durch die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) bzw. ein Verfahren zum spezifischen Nachweis solcher Nukleinsäuresequenzen in Gegenwart einer Probe, insbesondere in biologischen Flüssigkeiten.

Die Vermehrung von einzel- bzw. doppelsträngigen Nukleinsäuresequenzen in Gegenwart bestimmter Primer und eines die Polymerisation induzierenden Agens, wie z.B. hitzestabile DNA-Polymerasen oder reverse Transkriptasen, finden heutzutage eine breite Anwendung in der Molekularbiologie, molekularen Evolution, genetischen Untersuchungen, Forensik, Genom Analyse und Sequenzierung und insbesondere in der klinischen Diagnostik. Das mehrere Cyclen durchlaufende Verfahren ist hinlänglich als Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bekannt (EP 0 200 362, EP 0 258 017, Saiki et al., 1985, Science 230:1350-1354). Die PCR-Reaktion wird üblicherweise mit Hilfe der thermophilen DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus, sogenannter Taq-Polymerase durchgeführt. Dieses sogenannte klassische PCR-Verfahren zeigt jedoch eine Limitation wenn PCR Fragmente größer als 3 kb vervielfältigt werden sollen. Diese Limitation ist wahrscheinlich durch die fehlerhafte Ablesung des Enzyms bei dem Polymerisationsprozeß zurückzuführen.

Daher werden heute häufig DNA-Polymerasen wie z.B. aus Pyrococcus furiosus, sogenannte Pfu-Polymerasen verwendet (Lundberg, K.S. et al., Gene 108 (1991) 1-6). Die Pfu-Polymerase zeichnet sich durch eine zusätzliche Aktivität und zwar eine intrinsische 3'-(editing)-exonuclease-Aktivität (proofreading activity) aus und ist so imstande, die Mutationsrate pro Cyclen beträchtlich, und zwar um den Faktor von ungefähr 10, zu vermindern. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die proofreading-Polymerasen bei der Vervielfältigung von kurzen Sequenzen, d.h. bis ca. 3 kb, an ihre Grenzen stoßen. Eine Verbesserung in dieser Hinsicht ist von W. Barnes. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 2216-2220 bzw. WO 94/26766 beschrieben. Die Verbesserung nach Barnes besteht in dem Einsatz einer Mischung, bestehend aus zwei verschiedenen DNA-Polymerasen, wobei die eine sogenannte proofreading-Aktivität (wie z.B. Pfu) und die andere, im Überschuß vorliegende DNA-Polymerase keine proofreading-Aktivität (wie z.B. Taq) aufweist. Dadurch wird die Amplifikation von längeren DNA-Sequenzen, d.h. von bis zu 35 kb an Lambda DNA und 29,9 kb an humaner DNA (Cheng et al (1995) PCR Methods and Applications 4:294-298), jeweils abhängig von den verwendeten Primern, den Cyclenbedingungen bzw. Cyclenanzahl

oder sonstigen Bedingungen, eine höhere Effizienz als auch Ausbeute erzielt. Obwohl nun Nukleinsäuresequenzen bis zu 29 kb an human genomischer DNA und 42 kb an Lambda DNA amplifiziert werden können, sind die Ausbeuten dennoch relativ niedrig.

5 Eine Optimierung der PCR kann darüber hinaus nach dem Stand der Technik durch die Reduzierung der Menge an Pyrophosphat in der Reaktionsmischung erreicht werden. Als Pyrophosphat-reduzierendes Agens wurde insbesondere eine Pyrophosphatase verwendet (WO 90/12111, WO 94/05797). Der Zusatz einer thermostabilen Pyrophosphatase aus Thermus aquaticus zur PCR führte danach zu einer Verdopplung der Pro-
10 duktion der PCR-Produkte im Vergleich zur PCR ohne Pyrophosphatase (WO 90/12111). Kiselev et al. (WO 94/05797) verwendeten für den selben Zweck eine thermostabile Pyrophosphatase aus E. coli oder aus Thermus thermophilus. Während sich jedoch die Pyrophosphatase aus E. coli als nicht ausreichend thermostabil unter PCR-Bedingungen erwies, konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung einer thermo-
15 stabilen Pyrophosphatase aus Thermus thermophilus die effektive Amplifizierung von 10 kb langen Lambda DNA-Fragmenten möglich war.

Trotz der oben beschriebenen Optimierungen der PCR besteht nach wie vor ein Bedürf-
20 nis, längere PCR-Fragmente spezifisch und in zufriedenstellenden Ausbeuten zu amplifizieren.

Insbesondere lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde, für die spezifische Vervielfälti-
25 gung von Nukleinsäuresequenzen, die größer als 20 kb sind, Maßnahmen zur Verfügung zu stellen, durch die die im Stand der Technik beschriebenen Nachteile überwunden werden.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß eine Mischung bestehend aus einer thermosta-
30 bilen DNA-Polymerase mit proofreading-Aktivität, einer thermophilen DNA-Polymerase ohne proofreading-Aktivität sowie einer thermostabilen Pyrophosphatase zur Vervielfältigung von größeren Nukleinsäuresequenzen mittels PCR-Reaktion verwendet wird. Als vorteilhaft hat sich erwiesen, wenn die DNA-Polymerase ohne proofreading-Aktivität dabei im Überschuß vorliegt, vorzugsweise in einer mindestens 8fach höheren Konzentration als das Enzym mit proofreading-Aktivität. Die Pyrophosphatase liegt in einem Verhältnis von 0,5 - 0,1 Units zu ca. einer Unit gesamten Polymerasen-Konzentration vor.
35

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist, wenn ein oder zwei Enzyme verwen-
40 det werden, die die drei für die Enzymmischung erforderlichen Enzymaktivitäten aufweisen.

Für die proofreading-Aktivität aufweisende Polymerase kommen beispielsweise DNA-Polymerasen aus Pyrococcus furiosus (Pfu), aus Pyrococcus spezie GB-D, Thermotoga maritima (Tma), aus Pyrococcus woeisii (Pwo, DSM 3773), aus Thermococcus litoralis

(Tli) oder Sulfolobus solfataricus (Sso) in Betracht. Für das Enzym ohne proofreading-Aktivität haben sich Taq DNA-Polymerase oder entsprechende Analoge wie KlenTaq I (N-terminal verkürztes Enzym), das Klenowfragment der DNA-Polymerase I aus T. aquaticus (DSM 625) oder andere Polymerasen aus Thermus species (Tth, Tfl, Tfi, Tbr) als geeignet erwiesen. Für die Pyrophosphatase (PPase) kommen beispielsweise Enzyme aus Thermus thermophilus (TAh, DSM 579), oder anderen Thermus-Arten wie T. aquaticus sowie Enzyme aus thermophilen Archaeobakterien wie Sulfolobus acidocaltarius oder Thermoplasma acidophilum in Betracht. Erfindungsgemäß bevorzugt ist eine Mischung von Pwo und Taq im Verhältnis von ca. 1 : 10 und ein Verhältnis dieser Mischung zu PPase (Thermus thermophilus) von ca. 3,5 : 1.

Die Enzymmischung der Erfindung kann neben der Vervielfältigung langer Fragmente auch vorteilhaft zur Markierung von langen DNA-Fragmenten mit modifizierten Nukleotiden eingesetzt werden. Lange Fragmente bedeuten insbesondere Nukleinsäuresequenzen, die 20 kb oder mehr aufweisen. In bestimmten Fällen konnte mit der erfindungsgemäßen Mischung eine spezifische Amplifikation mit guter Ausbeute für DNA-Fragmente bis zu ca. 50 kb erzielt werden.

PCR Methoden die erlauben würden längere PCR Produkte mit größerer Effizienz zu amplifizieren, würden Genom Mapping und Sequenzierung, sowie die Klonierung und Mutagenese von großen Sequenzbereichen sowie die Diagnostik von Deletionen erleichtern.

Darüber hinaus hängen die optimalen Reaktionsbedingungen, wie Inkubationszeit, Temperatur, Pufferbedingungen, die Magnesium (Mg^{2+})-Konzentration bzw. die Konzentration der Enzymmischung vom jeweils verwendeten Template/Primer-Paar ab und sollte jeweils individuell bestimmt werden. Entsprechende Vorversuche gehören zu den für den Fachmann üblichen Maßnahmen.

Darauf aufbauend hat sich nun überraschenderweise ergeben, daß eine Mischung, die eine Gesamt-Enzymkonzentration im Bereich von 0,5 - 5 U/Testansatz aufweist, vorzugsweise haben sich ungefähr 2,5 U/Testansatz als optimal erwiesen. Für den Testansatz werden üblicherweise 50 µl verwendet.

Als optimale Mg^{2+} -Konzentration hat sich in den meisten Fällen ein Bereich von 0,5 - 5 mM, vorzugsweise ca. 1,5 - 3,0 mM, erwiesen. In der Regel wird $MgCl_2$ verwendet; die übliche Konzentration beträgt ca. 2,35 mM.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine Enzymmischung, bestehend aus einer thermostabilen DNA-Polymerase mit proofreading-Aktivität, einer thermophilen DNA-Polymerase ohne proofreading-Aktivität sowie einer thermostabilen Pyrophosphatase und Zusatz einer speziellen Reaktionspuffer-Salz-Mischung.

Als Reaktionspuffer-Salz-Mischung erwies sich eine Pufferlösung auf Basis von Tricine-Ammoniak und weiterer Salze als vorteilhaft. Erfindungsgemäß hat sich insbesondere eine Konzentration der Pufferkomponente im Bereich von ca. 5 - 100 mM, vorzugsweise von ca. 50 mM, sowie die Anwesenheit bestimmter Salze als vorteilhaft erwiesen. Als Salz hat sich Ammoniumsulfat und zwar in einer Konzentration von ca. 5 - 25 mM, bevorzugt von 7,5 - 10 mM als besonders vorteilhaft erwiesen. Der pH-Wert für die Amplifikation liegt erfindungsgemäß bei ca. 8,8 - 9,2, bevorzugt bei ca. 9,0.

Die Verwendung von DMSO als weiteres Additiv in einem Konzentrationsbereich bis zu ca. 10%, bevorzugt 2 - 4% hat sich als weiterer Vorteil erwiesen. Darüber hinaus kann die PCR-Reaktion erfindungsgemäß durch den Zusatz weiterer Substanzen wie beispielsweise Rinderserumalbumin in einer Konzentration von bis zu ca. 100 µg/ml, SH-Reagenzien wie Dithiothreitol oder beta-Mercaptoethanol üblicherweise in einem Konzentrationsbereich von 1,0 bis 80 mM, vorzugsweise 50 mM, oder ein Detergenz wie beispielsweise Tween 20 oder Nonidet NP40 in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 5,0%, vorzugsweise ca. 0,05 - 0,5%, Spermidin oder Glycerin in üblichen Konzentrationen weiter verbessert werden.

Es hat sich darüber hinaus gezeigt, daß die oben beschriebene Reaktionspuffer-Salz-Mischung, die einen Tricine-Ammoniak-Puffer mit einer Konzentration von ca. 50 mM, Ammoniumsulfat mit einer Konzentration von 7,5-25 mM, 2 - 4% DMSO, 0,1% TWEEN 20 und Mercaptoethanol mit einer Konzentration von ca. 10 mM aufweist, sich nicht nur für solche PCR-Reaktionen als Reaktionsgemisch eignet, die mit der erfindungsgemäßen Enzymmischung, sondern mit anderen bekannten Maßnahmen durchgeführt werden. Dies ist den Abbildungen 2 und 5 zu entnehmen.

Für die erfindungsgemäße Amplifikation von langen Fragmenten, hat sich insbesondere eine Temperatur für den Verlängerungsschritt von ca. 66 - 70°C, vorzugsweise von 68°C als vorteilhaft erwiesen. Die Elongationszeit beträgt zwischen ca. 10 und 35 Minuten, und hängt stark von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. Für DNA-Fragmente von 30 kb haben sich hier insbesondere 20 Minuten, für Fragmente von ca. 40 kb ca. 27 Minuten und für DNA-Fragmente in der Größenordnung von 50 kb ca. 35 Minuten, als vorteilhaft erwiesen. Die Elongationszeit sollte nach dem 10. Zyklus um jeweils 5 - 20 Sekunden pro Zyklus verlängert werden.

Für die Denaturierung während der Zyklen hat sich insbesondere eine Temperatur von ca. 92 - 94°C bewährt, vorzugsweise 92°C; die Denaturierungszeit sollte ca. 10 Sekunden betragen. Darüber hinaus hat sich die Verwendung von ultradünnen Reagenzgefäßen mit einem Volumen von ca. 0,2 ml als besonders vorteilhaft erwiesen.

- Ein für die Nukleinsäure-Amplifikation verwendetes Reagenz besteht im wesentlichen aus zwei Einzelmischungen. Die erste Mischung enthält die jeweilige Template-DNA, wie z.B. genomische DNA oder rekombinante DNA (z.B. Cosmide) in einem Konzentrationsbereich von ca. 1 bis 500 ng/Ansatz mit sogenannten upstream- und downstream-Primern (vorzugsweise je ca. 300 nM) und sämtliche für die DNA-Kettenverlängerung erforderlichen Nukleotide (Nukleotidtriphosphate), wie dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Für die einzelnen Nukleotide hat sich in der Regel eine Konzentration von jeweils 200 - 600 μ M; bevorzugt 500 μ M, als besonders geeignet erwiesen.
- 10 Die zweite Mischung enthält im wesentlichen den für die PCR-Reaktion erforderlichen Puffer und die erfindungsgemäße Enzymmischung in einer entsprechend höher konzentrierten Form, so daß sich nach Vermischung mit der ersten Mischung die erfindungsgemäßen Konzentrationen ergeben. Für die Amplifikation von langen Fragmenten haben sich Reaktionsansätze von 10 bis 100 μ l, vorzugsweise 50 μ l als vorteilhaft erwiesen.
- 15 Nach Zusammenmischung der Einzelmischungen wird die Probe in ein entsprechendes Thermocycler-Gerät eingebracht und zunächst zur Trennung des Doppelstranges des jeweiligen DNA-Fragments denaturiert (bei 92°C, 2 Minuten). Daran schließen sich die einzelnen Cyclen der PCR.

Abkürzungsverzeichnis

	AS	Ammoniumsulfat
	bp	Basenpaare
5	C	Celsius
	dATP	2'-Desoxy-adenin-5'-triphosphat
	dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
	dGTP	2'-Desoxy-guanin-5'-triphosphat
	dNTP	2'-Desoxy-nukleosid-5'-triphosphat
10	DTT	1,4-Dithiothreitol
	dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	EDTA	(Ethyldinitrilo)tetraessigsäure
	HCl	Salzsäure
15	kb	Kilobasen
	KCl	Kaliumchlorid
	Min.	Minute
	mM	milimolar
	μ M	mykromolar
20	ng	Nanogramm
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
	NH_3	Ammoniak
	PCR	Polymerase Ketten Reaktion
	Pwo	DNA Polymerase aus <i>Pyrococcus woessii</i>
25	Sek.	Sekunde
	Taq	DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
	Tth	DNA Polymerase aus <i>Thermus thermophilus</i>
	tPA	tissue Plasminogen Activator
	Tricine	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
30	Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
	U	Unit (Enzymeinheit)

Primerverzeichnis

- SEQ ID NO:1
5 tPA Primer 1: 5'-CCT TCA CTG TCT GCC TAA CTC CTT CGT GTG TTC
C-3'
- SEQ ID NO:2
10 tPA-Primer 2: 5'-TGT CTC CAG CAC ACA GCA TGT TGT CGG TGA C-3'
- SEQ ID NO:3
tPA-Primer 3: 5'-CAA AGT CAT GCG GCC ATC GTT CAG ACA CAC C-3'
- SEQ ID NO:4
15 Beta-Globin Primer 1: 5'-CAC AAG GGC TAC TGG TTG GCG ATT-3'
- SEQ ID NO:5
Beta-Globin Primer 2: 5'-AGC TTC CCA ACG TGA TCG CCT T-3'
- 20 SEQ ID NO:6
Beta-Globin Primer 3: 5'-CAC TTG TTT AGG CCT TAG CGG GCT-3'
- SEQ ID NO:7
Beta-Globin Primer 4: 5'-TGC TGC TCT GTG CAT CCG AGT G-3'
- 25 SEQ ID NO:8
Beta-Globin Primer 5: 5'-TGA GAC TTT TGT CCC AGC AGG TGT-3'
- SEQ ID NO:9:
30 Beta-Globin Primer 6: 5'-CCT TCA CCA TGT CCC TGC AAA GAC-3'
- SEQ ID NO 10:
Lambda Primer 1: 5'-CTG ATG AGT TCG TGT CCG TAC AAC TGG CGT AAT
C-3'
- 35 SEQ ID NO 11:
Lambda Primer 2: 5'-GTG CAC CAT GCA ACA TGA ATA ACA GTG GGT
TAT C-3'
- SEQ ID NO 12:
40 Lambda Primer 3: 5'-GAA ACC ATG CAG GAG ATT AAC ACT CTG CTG
ATC G-3'

- SEQ ID NO 13:
Lambda Primer 4: 5'-GAA AGT TAT CGC TAG TCA GTG GCC TGA AGA
GAC G-3'
- 5 SEQ ID NO 14:
Lambda Primer 5: 5'-ATT ATG TCG GTG ATA CTT CGT CGC TGT CTC-3'
- SEQ ID NO 15:
Lambda Primer 6: 5'-TAA TGC AAA CTA CGC GCC CTC GTA TCA CAT-3'
- 10 SEQ ID NO 16:
Lambda Primer 7: 5'-CGG TTT AAG GCG TTT CCG TTC TTC TTC GTC-3'
- SEQ ID NO 17:
15 tPA Primer 4: 5'-CCT TCA CTG TCT GCC TAA CTC CTT CGT GTG TTC
C-3'
- SEQ ID NO 18:
20 tPA Primer 5: 5'-ACT GTG CTT CCT GAC CCA TGG GAG AAG CGC CTT
C-3'

Legenden zu den Abbildungen:Abbildung 1

5

Amplifikation von 23 kb (Spur 2), 24 kb (Spur 3), 27 kb (Spur 4), 28.3 kb (Spur 5), 29.9 kb (Spur 6), 31 kb (Spur 7) und 35 kb (Spur 8) Fragmenten aus humaner, genomischer DNA mit Taq/Pwo/PPase-Enzymmischung (erfindungsgemäß).

10

Abbildung 2

Amplifikation eines 28,3 kb Fragments aus dem humanen beta-Globin Gen mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase (Stand der Technik, Spur 3) und Taq/Pwo/PPase Mischung (erfindungsgemäß, Spur 4) mit Tris Puffer (Stand der Technik, Spur 5) und Tricine-NH₃-Puffer (erfindungsgemäß, Spur 6).

15

Die Enzymmischung mit PPase zeigt bei jeder Pufferbedingung deutlich mehr PCR-Produkt als die Enzymmischung ohne PPase. Eine weiter verbesserte Produktausbeute wird in Kombination der Enzymmischung mit PPase mit einem Tricine- NH₃-Puffer erzielt.

Abbildung 3

25

Amplifikation von 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35 kb, 40 kb und 47 kb aus Lambda DNA mit Taq/Pwo/PPase-Enzymmischung (erfindungsgemäß).

Abbildung 4

30

Amplifikation von 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35, kb und 40 kb Fragmenten aus Lambda DNA mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase und Tris-HCl-Puffer (Stand der Technik) und Taq/Pwo/PPase Mischung und Tricine-NH₃-Puffer (erfindungsgemäß) unter Verwendung von limitierender Menge an Lambda DNA. Dabei bedeuten:

35

Spur 3 20 kb Fragment mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase- und Tris-HCl-Puffer
Spur 5 25 kb Fragment mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase- und Tris-HCl-Puffer
Spur 7 30 kb Fragment mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase- und Tris-HCl-Puffer
40 Spur 9 35 kb Fragment mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase- und Tris-HCl-Puffer
Spur 11 40 kb Fragment mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase- und Tris-HCl-Puffer
Spur 4 20 kb Fragment mit Taq/Pwo-PPase-Mischung und Tricine-Ammoniak-Puffer

- Spur 6 25 kb Fragment mit Taq/Pwo-PPase-Mischung und Tricine-Ammoniak-Puffer
- Spur 8 30 kb Fragment mit Taq/Pwo-PPase-Mischung und Tricine-Ammoniak-Puffer
- 5 Spur 10 35 kb Fragment mit Taq/Pwo-PPase-Mischung und Tricine-Ammoniak-Puffer
- Spur 12 40 kb Fragment mit Taq/Pwo-PPase-Mischung und Tricine-Ammoniak-Puffer
- 10 Die Enzymmischung mit PPase zeigt bei allen Längen deutlich mehr PCR Produkt als die Enzymmischung ohne PPase.

Abbildung 5

Amplifikation eines 15 kb Fragmentes aus dem tPA-Gen aus humaner genomischer DNA mit Taq/Pwo-Enzymmischung (Stand der Technik) und Tris-HCl-Puffer (Stand der Technik) sowie Taq/Pwo-Enzymmischung (Stand der Technik) und Tricine-NH₃-Puffer (erfindungsgemäß).

Die Verwendung des Tricine-NH₃-Puffer zeigt deutlich mehr PCR-Produkt in Kombination mit Taq/Pwo-Enzymmischung als die Verwendung von Tris-HCl-Puffer.

10

Spur 1 und 2: 15 kb Fragment aus tPA-Gen mit Taq/Pwo-Enzymmischung und Tris-HCl-Puffer

Spur 2 und 3: 15 kb Fragment aus tPA-Gen mit Taq/Pwo-Enzymmischung und Tricine-NH₃-Puffer

15

Die folgenden Beispiele verdeutlichen die Erfindung weiter:

Beispiel 1:

- 5 In den gezeigten Beispielen wurde als Taq/Pwo/PPase Enzymmischung (erfindungsge-
mäß) die thermostabilen Polymerasen von *Thermus aquaticus* (Taq) und *Pyrococcus*
woesii (Pwo) sowie die thermostabile PPase von *Thermus thermophilus* verwendet. Das
Mischungsverhältnis der beiden Polymerasen war 10 : 1 (Taq : Pwo) nach Aktivität
10 (Units). Das Mischungsverhältnis Polymerasen zu PPase war 3,6 : 1 nach Aktivität
(Units). Eine typische Enzymmischung war 3,5 U Taq Polymerase + 0,3 U Pwo Poly-
merase + 1 U PPase pro µl. Die Enzymmischung wurde in Lagerpuffer (20 mM
Tris/HCl, pH 7,5 (20°C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween20,
0,5% Nonidet P40, 50% Glycerin) bei -20°C gelagert.
- 15 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde im 50 µl Volumen durchgeführt. Die
Reaktionsbedingungen für die Enzymmischung war wie folgt:

	PCR-Puffer:	7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 50 mM Tricine/ NH ₃ (20°C) DMSO 2%, 0,5% Tween 20; 50 mM Mercapto- ethanol pH 9,0
20	MgCl ₂	2,35 mM
	Enzymmischung	2,6 U (0,75 µl)
	dNTP	500 µM (jeweils)
	Primer forward	300 nM
25	Primer reverse	300 nM

Als Template wurde 250 ng genomische DNA (human) verwendet .
Folgende Primerpaare und Bedingungen wurden verwendet:

- 30 1) Beta-Globin Primer 1 + 2 (23 kb)
2) tPA-Primer 1 + 2 (24 kb)
3) tPA Primer 1 + 3 (27 kb)
4) Beta-Globin Primer 3 + 2 (28,3 kb)
5) Beta-Globin Primer 1 + 4 (29,9 kb)
35 6) Beta-Globin Primer 1 + 5 (31 kb)
7) Beta-Globin Primer 6 + 2 (35 kb)

Der PCR Ansatz wurde über zwei Mastermixe hergestellt:

Komponente	Volumen	Endkonzentration in der PCR
Mastermix 1		
Steriles bdest. H ₂ O	bis zu 25 µl	
10 mM dATP	2,5 µl	500 µM dATP
10 mM dCTP	2,5 µl	500 µM dCTP
10 mM dGTP	2,5 µl	500 µM dGTP
10 mM dTTP	2,5 µl	500 µM dTTP
downstream primer	x µl	400 nM downstream primer
upstream primer	x µl	400 nM upstream primer
template DNA	x µl	250 ng genomische DNA
Mastermix 2:		
Steriles bdest. H ₂ O	bis zu 25 µl	
5 x Puffer	10 µl	1 x
Enzymmix	0,75 µl	2,6 units

- 5 Kurz vor Zyklusbeginn auf Eis Mastermix 1 (25µl) und Mastermix 2 (25µl) zusammen pipettieren. Gut mischen (es muß gewährleistet sein, daß die Komponenten gut durchmischt sind) und Reaktionsansatz mit 30 µl Mineralöl bedecken.

Die Amplifikationen wurden in einem Perkin Elmer GenAmp 9600 Thermocycler mit folgendem Cycleprogramm durchgeführt:

- 10 1x Denaturierung für 2 Min. bei 92°C
Denaturierung für 10 Sek. bei 92°C
- 15 10x Annealing für 30 Sek. bei 65°C
Elongation für 15 - 25 Min.* bei 68°C
Denaturierung für 10 Sek. bei 92°C
- 20x Annealing für 30 Sek. bei 60°C
Elongation für 15 - 25 Min.* bei 68°C + Cycle
20 Verlängerung für 20 Sek. für jeden weiteren Cycle
- 1x 7 Min. bei 68°C

** Die Elongationszeit ist abhängig von der Fragmentlänge. Der Zusammenhang zwischen Produktlänge und Elongationszeit ist in der folgenden Tabelle aufgelistet.

PCR Fragmentlänge (kb)	20	25	30	35	40	45
Elongationszeit (Minuten)	15	19	22	26	30	34

5 20 µl des erhaltenen PCR Produktes wurde auf einem 0,5%igen Agarose-Gel analysiert.

Abb. 1 zeigt die Amplifikation von 23 kb, 24 kb, 27 kb, 28,3 kb, 29,9 kb, 31 kb und 35 kb Fragmenten aus humaner, genomischer DNA mit Taq/Pwo/PPase-Enzymmischung (erfindungsgemäß).

10

Beispiel 2:

Die Amplifikationsbedingungen waren identisch wie im Beispiel 1. Neben der Taq/Pwo/PPase Enzymmischung und des Tricine-NH₃-Puffers wurde noch eine Taq/Pwo Enzymmischung mit dem Verhältnis 10 : 1 nach Units und ein Tris-HCl-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 9,2, 16 mM (NH₄)₂SO₄, DMSO 2%, Tween 20, 1%, 2,25 mM MgCl₂) verwendet.

20 Template DNA (human-genomische DNA) war 250 ng. Als Primer wurde Beta-Globin Primer 3 als forward Primer und Beta-Globin Primer 2 als reverse Primer verwendet.

Abbildung 2 zeigt die Amplifikation eines 28,3 kb Fragments aus dem humanen beta-Globin Gen mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase (Stand der Technik) und Taq/Pwo/PPase Mischung (erfindungsgemäß) mit Tris Puffer (Stand der Technik) und Tricine-NH₃ Puffer (erfindungsgemäß).

Die Enzymmischung mit PPase zeigt bei jeder Pufferbedingung deutlich mehr PCR Produkt als die Enzymmischung ohne PPase. Die größte Produktausbeute wird aber nur in der Kombination von Enzymmischung mit PPase und dem Tricine-NH₃ Puffer erzielt.

35

Beispiel 3:

Eine Reihe von verschiedenen PCR Fragmenten wurden aus 10 ng Lambda DNA amplifiziert. Die Bedingungen für die PCR Reaktion sowie das Cycle Programm waren wie in Beispiel 1 beschrieben mit folgenden Änderungen:

Es wurden 25 Zyklen mit folgende Primerpaare und Bedingungen verwendet:

- 1) Lambda Primer 1 und 2 (20 kb)
- 2) Lambda Primer 1 und 3 (25 kb)
- 5 3) Lambda Primer 1 und 4 (30 kb)
- 4) Lambda Primer 1 und 5 (35 kb)
- 5) Lambda Primer 1 und 6 (40 kb)
- 6) Lambda Primer 7 und 6 (47 kb)

- 10 Abbildung 3 zeigt die Amplifikation von 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35 kb, 40 kb und 47 kb aus Lambda DNA mit Taq/Pwo/PPase-Enzymmischung (erfindungsgemäß).

Beispiel 4:

- 15 Die Amplifikationsbedingungen als auch die Zyklenbedingungen waren wie im Beispiel 3 aufgeführt, mit folgenden Änderungen:

- 20 Die Menge an Lambda DNA war 10 pg für das 20 kb und 25 kb Fragment und 1 ng für die anderen Beispiele.

Die Taq/Pwo Enzymmischung sowie der dazu verwendete Tris-HCl-Puffer ist wie unter Beispiel 3 beschrieben.

- 25 Abbildung 4 zeigt die Amplifikation von 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35, kb und 40 kb Fragmenten aus Lambda DNA mit Taq/Pwo-Mischung ohne PPase und Tris-HCl-Puffer (Stand der Technik) und Taq/Pwo/PPase Mischung und Tricine-NH₃ Puffer (erfindungsgemäß) unter Verwendung von limitierender Menge an Lambda DNA.

- 30 Die Enzymmischung mit PPase zeigt bei allen Längen deutlich mehr PCR Produkt als die Enzymmischung ohne PPase.

Beispiel 5:

- 35 Die Amplifikationsbedingungen entsprechen den in Beispiel 1 (Tricine-Puffer) und Beispiel 2 (Taq/Pwo-Enzymmischung und Tris-Puffer) beschriebenen. Als Template-DNA (human genomische DNA) wurden 50 ng eingesetzt. Als Primer wurden TPA-Primer 4 (forward) und tPA Primer 5 (reverse) eingesetzt; die Annealing-Temperatur
- 40 betrug 63°C; die Elongationszeit war 10 Minuten. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Abbildung 5 zeigt, daß die Verwendung des Tricine-NH₃-Puffer deutlich mehr PCR-Produkt in Kombination mit Taq/Pwo-Enzymmischung als die Verwendung von Tris-HCl-Puffer ergibt.

5 SEQ. ID NO: 17

tPA Primer 4: 5'-CCT TCA CTG TCT GCC TAA CTC CTT CGT GTG TTC C-3'

SEQ. ID NO: 18

tPA Primer 5: 5'-ACT GTG CTT CCT GAC CCA TGG GAG AAG CGC CTT C-3'

10

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(B) STRASSE: Sandhofer Str. 116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: D-68305

(G) TELEFON: 0621/759-3277

(H) TELEFAX: 0621/759-4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von langen Nukleinsäuren durch die PCR

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 16

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(v) DATEN DER PRIORITÄTSANMELDUNG:
ANMELDENUMMER:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCTTCACTGTCTGCCTAACTCCTTCGTGTGTTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TGTCTCCAGCACACAGCATGTTGTCGGTGAC

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CAAAGTCATGCGGCCATCGTTCAGACACACC

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CACAAGGGCTACTGGTTGGCGATT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AGCTTCCCAACGTGATCGCCTT

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CACTTGTTTAGGCCTTAGCGGGCT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TGCTGCTCTGTGCATCCGAGTG

22

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:
- TGAGACTTTTGTCCCAGCAGGTGT 24
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:
- CCTTCACCATGTCCCTGCAAAGAC 24
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:
- CTGATGAGTTCGTGTCCGTACAACGGCGTAATC 34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GTGCACCATGCAACATGAATAACAGTGGGTTATC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GAAACCATGCAGGAGATTAACACTCTGCTGATCG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GAAAGTTATCGCTAGTCAGTGGCCTGAAGAGACG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

ATTATGTCGGTGATACTTCGTCGCTGTCTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TAATGCAAACACTACGCGCCCTCGTATCACAT

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CGGTTTAAGGCGTTTCCGTTCTTCTTCGTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 5 (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- 10 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

15 CCTTCACTGTCTGCCTAACTCCTTCGTGTGTTCC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 20 (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- 25 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

30 ACTGTGCTTCCTGACCCATGGGAGAAGCGCCTTC

34

Patentansprüche

1. Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von ein- oder doppelsträngigen DNA-Fragmenten in Gegenwart mindestens eines geeigneten Primer-Paares, einer zwischen pH 8,8 und 9,2 puffernden Substanz, sämtlicher für die DNA-Kettenverlängerung erforderlichen Nukleotide (dNTPs) und einer Enzymmischung, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymmischung aus einer thermophilen DNA-Polymerase mit proofreading-Aktivität, einer thermophilen DNA-Polymerase ohne proofreading-Aktivität und einer thermostabilen Pyrophosphatase besteht und nach gegebenenfalls stattgefundenem Denaturierungsschritt, der Elongationsschritt zwischen 10 und 35 Minuten bei 66 - 70°C durchgeführt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein- oder doppelsträngige DNA-Fragmente, die länger als 20 kb sind, amplifiziert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als puffernde Substanz Tricine-Ammoniak verwendet wird und Ammoniumsulfat verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Tricine-Ammoniak-Puffer in einer Konzentration von 5 - 100 mM und Ammoniumsulfat in einer Konzentration von 5 - 20 mM vorliegt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymmischung eine DNA-Polymerase ohne proofreading-Aktivität im Überschuß aufweist.
6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die thermostabile Pyrophosphatase in einem Verhältnis von ca. 0,5 - 0,1 Einheiten zu ca. 1 Einheit der gesamten Polymeraseaktivität vorliegt.
7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymmischung eine DNA-Polymerase erhältlich aus Pyrococcus woesii, eine DNA-Polymerase erhältlich aus Thermus aquaticus und eine Pyrophosphatase erhältlich aus Thermus thermophilus aufweist, wobei die Gesamtenzymaktivität ca. 0,5 U bis 5,0 U in der Reaktionsmischung beträgt.
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Magnesiumionen in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 5,0 mM zugegen sind.

9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Magnesiumionen in einem Konzentrationsbereich von ca. 1,5 bis 3,0 mM zugegen sind und/oder die Konzentration der einzelnen dNTPs jeweils über 200 μ M beträgt.
10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ungefähr 5 bis 10 mM Ammoniumsulfat in der Reaktionsmischung, die einen Ausgangs-pH-Wert von ca. 9,0 aufweist, vorhanden sind.
11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elongationstemperatur ca. 68°C beträgt.
12. Enzymmischung bestehend aus einer thermophilen DNA-Polymerase mit proof-reading-Aktivität und einer thermophilen DNA-Polymerase ohne proofreading-Aktivität im Verhältnis 1 : 10 sowie einer Mischung dieser Polymerasen zur Pyrophosphatase erhältlich aus Thermus thermophilus im Verhältnis 3,5 : 1 wobei die Konzentration der Enzyme so angelegt ist, daß sie 0,5 bis 5,0 Einheiten/Volumen Reaktionsmischung beträgt und die Reaktionsmischung einen Tricine-Ammoniak-Puffer sowie ein Ammoniumsalz enthält.
13. Enzymmischung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Polymerase aus erhältlich Pyrococcus woessii, eine DNA-Polymerase erhältlich aus Thermus aquaticus und eine Pyrophosphatase erhältlich aus Thermus thermophilus sowie Magnesiumionen in einer Konzentration von 0,5 bis 5,0 mM enthalten sind.
14. Verwendung der Enzymmischung gemäß Anspruch 12 oder 13 zur Vervielfältigung langer DNA-Fragmente und/oder Markierung von DNA-Fragmenten mit modifizierten Nukleotiden.
15. Verwendung gemäß Anspruch 12 oder 13 dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Fragmente länger als 20 kb erzielbar sind.
16. Verwendung einer Mischung, die einen Tricine-Ammoniak-Puffer in einer Konzentration von ca. 5 - 100 mM, Ammoniumsulfat in einer Konzentration von ca. 5,0 - 25 mM, von ca. 2 - 4% DMSO, ca. 0,05 - 0,5% TWEEN 20 und Mercaptoethanol in einer Konzentration von ca. 10 mM aufweist, zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten.

Fig. 1

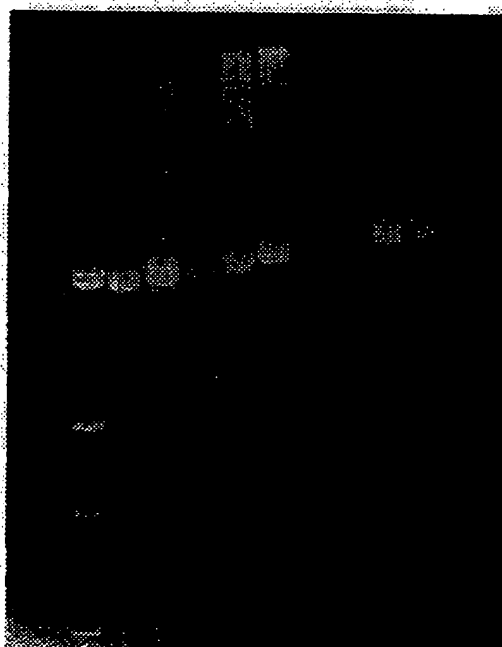


Fig. 2

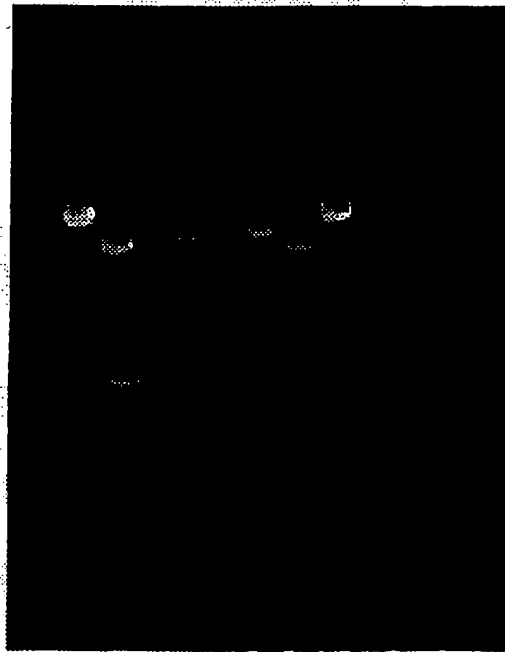


Fig. 3

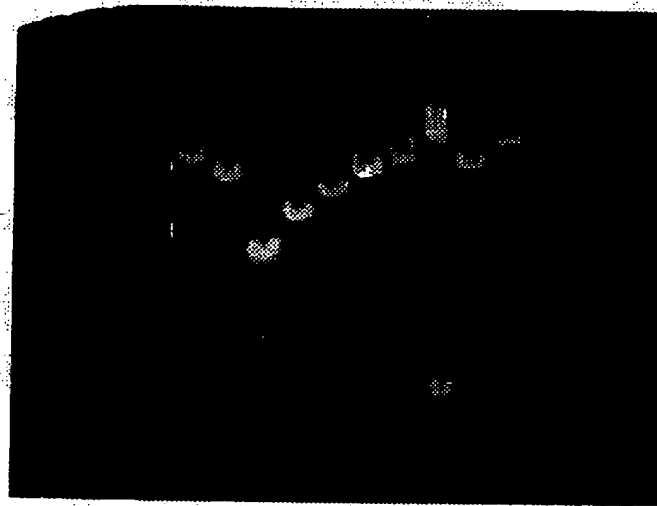


Fig. 4

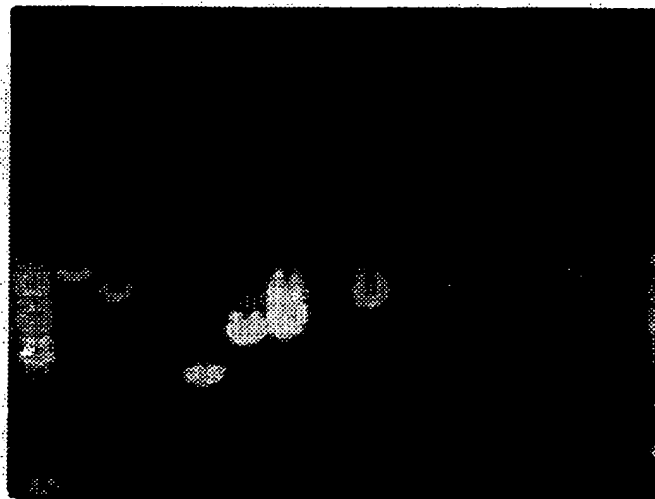
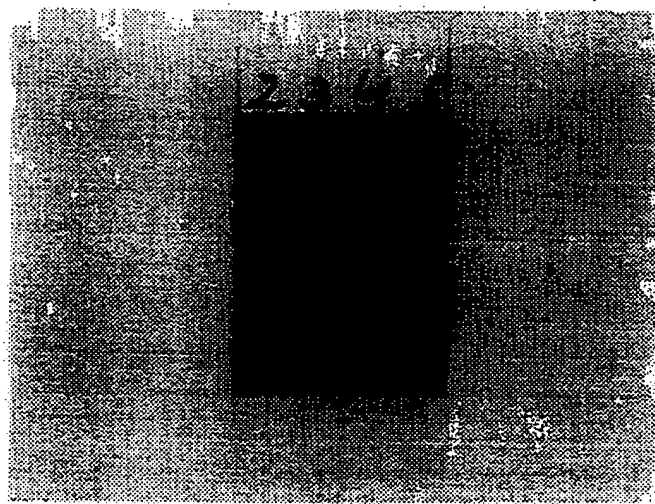


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/01494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 256 555 A (MILBURN SUSAN C ET AL) 26 October 1993 see the whole document ---	1,2,5,6, 8,9,11, 12,15
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, - March 1994 pages 2216-2220, XP002034119 BARNES W. M. : "PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from 1 bacteriophage templates" cited in the application discussion and results ---	1,2,5,6, 8,9,11, 12,15
Y	WO 94 05797 A (KISELEV VSEVOLOD ;SEVERIN EVGENII (RU); KORPELA TIMO (FI)) 17 March 1994 see the whole document ---	1-6, 8-12, 14-16
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 1997

Date of mailing of the international search report

15.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/01494

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, - June 1994 pages 5695-5699, XP002034120 CHENG S. ET AL.,: "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA" see the whole document ---	1-6, 8-12, 14-16
Y	WO 95 16028 A (STRATAGENE INC) 15 June 1995 see the whole document ---	1,2,5-15
Y	WO 90 12111 A (HARVARD COLLEGE) 18 October 1990 see the whole document -----	1,2,5-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/01494

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5256555 A	26-10-93	NONE	
WO 9405797 A	17-03-94	FI 923911 A AU 4960893 A	02-03-94 29-03-94
WO 9516028 A	15-06-95	US 5556772 A	17-09-96
WO 9012111 A	18-10-90	AU 638246 B AU 5438290 A EP 0467953 A JP 4506002 T LT 1519 A US 5498523 A	24-06-93 05-11-90 29-01-92 22-10-92 26-06-95 12-03-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01494

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile.	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 256 555 A (MILBURN SUSAN C ET AL) 26.Oktober 1993 siehe das ganze Dokument ---	1,2,5,6, 8,9,11, 12,15
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 91, - März 1994 Seiten 2216-2220, XP002034119 BARNES W. M. : "PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from 1 bacteriophage templates" in der Anmeldung erwähnt Diskussion und Ergebnisse ---	1,2,5,6, 8,9,11, 12,15
Y	WO 94 05797 A (KISELEV VSEVOLOD ;SEVERIN EVGENII (RU); KORPELA TIMO (FI)) 17.März 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-6, 8-12, 14-16

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Juli 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. 07. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01494

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 91, - Juni 1994 Seiten 5695-5699, XP002034120 CHENG S. ET AL.,: "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA" siehe das ganze Dokument ---</p>	<p>1-6, 8-12, 14-16</p>
Y	<p>WO 95 16028 A (STRATAGENE INC) 15.Juni 1995 siehe das ganze Dokument ---</p>	<p>1,2,5-15</p>
Y	<p>WO 90 12111 A (HARVARD COLLEGE) 18.Oktober 1990 siehe das ganze Dokument -----</p>	<p>1,2,5-15</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01494

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5256555 A	26-10-93	KEINE	
WO 9405797 A	17-03-94	FI 923911 A AU 4960893 A	02-03-94 29-03-94
WO 9516028 A	15-06-95	US 5556772 A	17-09-96
WO 9012111 A	18-10-90	AU 638246 B AU 5438290 A EP 0467953 A JP 4506002 T LT 1519 A US 5498523 A	24-06-93 05-11-90 29-01-92 22-10-92 26-06-95 12-03-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.